

Analyses chromatographiques des composés phénoliques d'amandes de graines de cotonniers (*Gossypium hirsutum* L. et *G. barbadense* L.)*

C. Tchiegang et J. Bourély

IRCT, Centre de recherches CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

Résumé

La chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), couplée à la spectrophotométrie UV/visible utilisant un détecteur à barrettes de diode ont permis de montrer que les composés phénoliques présents dans les amandes de graines de cotonniers sont les flavonoïdes (dérivés de quercétol et de kaempférol), les acides phénoliques (dérivés para-coumarique et férulique) pour les variétés *glandless* (sans glande à gossypol) et, en plus, le gossypol pour les amandes de cotonniers à glandes.

Dans les amandes de graines de cotonniers à glandes, le gossypol est le composé phénolique majeur devant les flavonoïdes et les acides phénoliques alors que, dans les amandes sans glande, les flavonoïdes sont dominants par rapport aux acides phénoliques. La concentration en composés phénoliques est inférieure dans les amandes de cotonniers sans glande.

MOTS-CLÉS : *Gossypium*, amandes, composés phénoliques, chromatographie (CCM et HPLC).

Introduction

Les composés phénoliques sont largement distribués chez les végétaux et jouent un rôle essentiellement métabolique. Ce sont des substances naturelles, auxquelles on accorde de plus en plus d'intérêt en raison de leurs effets sur la qualité nutritionnelle, sur le goût et la couleur des aliments.

Les amandes des cotonniers renferment un composé phénolique majeur, le gossypol, toxique pour l'homme et les animaux (surtout les monogastriques), qui n'appartient ni à la famille des acides phénoliques ni à celle des flavonoïdes.

Si beaucoup d'études ont été effectuées sur le gossypol, depuis sa synthèse jusqu'à ses utilisations pharmaceutiques, les autres composés phénoliques des amandes de graines de cotonniers ont été peu étudiés. Par chromatographie en phase gazeuse (CPG), MAGA et LORENZ (1974), DABROWSKY et SOSULSKI (1984) ont identi-

fié les acides phénoliques suivants dans les amandes de cotonniers : les acides chlorogénique, caféique, sinapique, coumarique, vanillique, protocatéchique, férulique et salicylique. Par chromatographie sur couche mince (CCM), BLOUTIN *et al.* (1981) ont montré que les flavonoïdes sont représentés par les dérivés du quercétol et du kaempférol.

Plus récemment, l'HPLC couplée à la spectrophotométrie UV/visible utilisant un détecteur à barrettes de diode a permis à HOSTETTMANN *et al.* (1984), HOSTETTMANN (1985), SIEWEK et GALENSA (1984) de séparer et de caractériser par leurs spectres UV, les composés phénoliques (flavonoïdes et xanthones) de *Gentiana* sp.

Le but de ce travail est la caractérisation des composés phénoliques des amandes de cotonniers (par chromatographie sur couche mince et par HPLC munie d'un détecteur à barrettes de diode) et l'estimation de leurs teneurs par HPLC.

* Cet article constitue la première partie de la thèse de Doctorat, soutenue le 31 janvier 1989 à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc (USTL) de Montpellier, par Mr C. TCHIEGANG sur « L'étude des composés phénoliques des amandes des graines de cotonniers, dans l'optique de la détoxification et de l'utilisation alimentaire des amandes et de leurs dérivés ».

Matériel et méthodes

Nature des échantillons

Les amandes de 4 variétés de cotonniers sont étudiées. Trois variétés appartiennent à l'espèce *Gossypium hirsutum* L. Il s'agit de la variété bulgare à glandes Pavlikéni expérimentée à Montpellier, des variétés sans glande BC4 cultivée en Côte d'Ivoire et F 281 mise au point au Tchad. La dernière variété à glandes, Giza 75, cultivée en Egypte, appartient à l'espèce *Gossypium barbadense* L.

Nos échantillons sont préparés de la manière suivante: le coton-graine, produit de la récolte, est séparé en fibres et graines. Ces dernières sont défilées à l'acide sulfurique, puis décortiquées sur une petite machine de laboratoire pour récupérer les amandes.

Extraction des composés phénoliques

Le protocole opératoire que nous avons suivi est décrit par FLEURIET et MACHEIX (1972). 4 g d'amandes sont broyés dans un mortier puis traités sous agitation avec 100 ml d'éthanol à 80 %, à froid, pendant 45 mn (fig. 1). On filtre et on poursuit l'extraction du résidu solide 4 fois avec le même solvant. L'extrait hydroalcoolique obtenu renferme de nombreuses substances non phénoliques (acides gras, pigments, sucres, acides organiques, etc.) qui doivent être éliminées. Pour cela, l'éthanol est évaporé sous vide à 40° C et l'extrait aqueux est alors débarrassé des substances liposolubles par 5 lavages avec le même volume d'hexane distillé.

Les composés phénoliques de l'extrait délipidé et dépigmenté sont extraits 5 fois par le même volume d'acétate d'éthyle, après acidification et renforcement de la force ionique par adjonction d'acide métaphosphorique et de sulfate d'ammonium (FLEURIET et MACHEIX, 1972; MACHEIX, 1974). Les différentes fractions de composés phénoliques sont réunies, évaporées à 40° C et récupérées par le méthanol pur. Elles constituent l'extrait méthanolique final (fig. 1).

Notons qu'au cours de la délipidation par l'hexane des extraits provenant d'amandes à glandes, une partie du gossypol est éliminée en même temps que les lipides.

Nous avons déterminé par la méthode colorimétrique Ba 7-58 de l'A.O.C.S. (1958) que la perte en gossypol s'élevait à environ 72 % du gossypol présent dans le résidu brut de composés phénoliques. Ceci rend, par conséquent, impossible la détermination de la teneur en gossypol libre en même temps que celle des autres composés phénoliques.

Pour extraire le gossypol libre, nous avons utilisé l'acétone aqueuse à 70 % (PONS et GUTHRIE, 1949) qui est le solvant préconisé par la méthode officielle Ba 7-58 de l'A.O.C.S. (1958). A partir de l'extrait de gossypol obtenu de cette manière, pour rendre possible son analyse par HPLC, l'acétone est évaporée et le résidu de gossypol libre est

repris par un mélange de méthanol pur et de diéthyléther dans les proportions 95/5 (vol/vol) (TCHIEGANG, 1989).

Méthodes utilisées pour la caractérisation des composés phénoliques

Spectrophotométrie UV/visible

Les spectres des extraits hydroalcooliques bruts ou purifiés des composés phénoliques sont enregistrés entre 200 et 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer 551 muni d'un enregistreur Perkin-Elmer 56.

Chromatographie sur couche mince

• Séparation des composés phénoliques

On emploie des plaques Merck, en aluminium (20 x 20 cm), recouvertes d'une couche de cellulose de 0,1 mm d'épaisseur, sans indicateur de fluorescence.

La chromatographie est ascendante et bidimensionnelle. On utilise, en première dimension, la phase supérieure du mélange de Méthylisobutylcétone/acide Formique/Eau (M.F.E.) dans les proportions 3/1/2 (vol/vol) et, en seconde dimension, l'acide acétique glacial à 5 % dans l'eau distillée.

• Révélation chimique des chromatoplaques

Un certain nombre de composés phénoliques sont naturellement colorés (flavonoïdes, gossypol). Les autres nécessitent l'emploi de réactifs chimiques pour être décelés sur les plaques. Pour cela, nous avons utilisé :

- la lumière UV, à 254 et 366 nm -en l'absence ou en présence de vapeurs d'ammoniaque- à laquelle la plupart des composés phénoliques sont sensibles ;

- l'azote liquide. Il stimule la fluorescence de nombreux composés phénoliques à 254 nm RIBERAU-GAYON, (1968) ;

- la para-nitroaniline diazotée préparée selon le procédé SWAIN décrit par RIBERAU-GAYON, (1968) ;

- le chlorure ferrique à 1 % dans l'eau distillée, composé qui n'est cependant pas spécifique des fonctions phénoliques (RIBERAU-GAYON 1968) ;

- le réactif de Benedikt (REZNIK et EGGER, 1961) qui permet de repérer, en lumière UV, les composés possédant un groupe o-diphénolique libre. Ceux qui n'en présentent pas se définissent alors comme des monophénols hydroxycinnamiques ;

- le chlorure d'aluminium à 1 % dans l'éthanol (STAHL, 1965; RIBERAU-GAYON, 1968) qui confirme la présence des flavonoïdes et les rend orange fluorescent sous les UV ;

- le réactif de Neu (1956) qui détecte les flavonoïdes monophénols ou diphénols sous les UV à 366 nm ;

- la vaniline à 1 % dans l'HCl 12N qui détecte la plupart des flavan-3-ols.

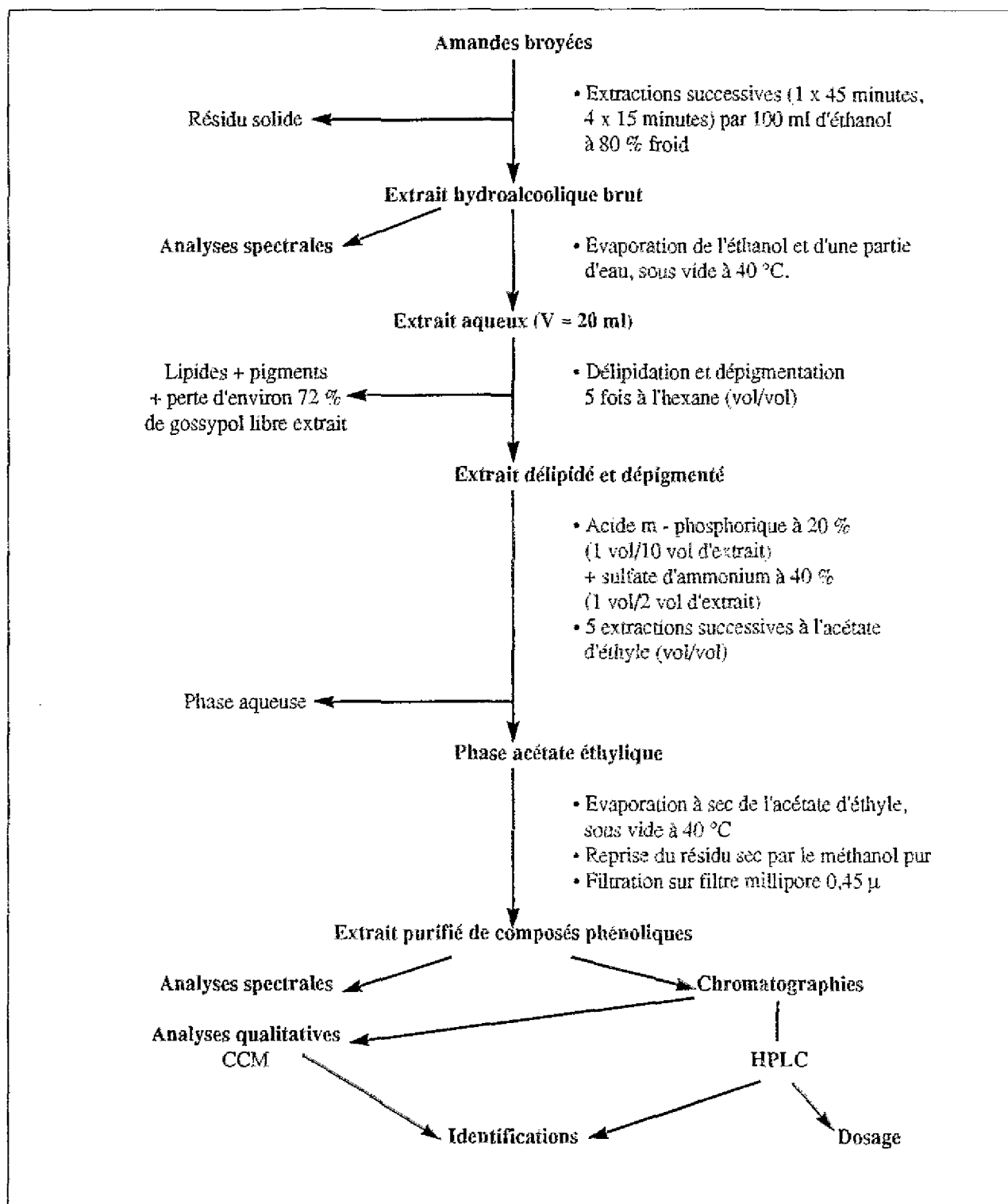


Figure 1

Protocole d'extraction des composés phénoliques des amandes de graines de cotonniers.

Procedure for the extraction of phenolic compounds from cotton seed kernels.

Caractérisation des composés phénoliques par chromatographie en phase liquide à haute performance

En utilisant un spectrophotomètre UV/visible à barrettes de diode, l'HPLC permet de caractériser, par son spectre d'absorption, chaque pic séparément. Dans un premier temps, on trace les chromatogrammes des extraits phénoliques à 280 ou 360 nm, de manière à individualiser par un pic chaque composé phénolique. Ensuite, les barret-

tes de diode permettent d'obtenir, par balayage à des longueurs d'ondes comprises entre 200 et 400 nm, le spectre de chaque composé séparé.

L'appareillage est le suivant :

- un ensemble chromatographe HPLC Varian 5000 muni d'un détecteur à barrettes de diode Hewlett-Packard (HP-1040M) ;

- un ordinateur Hewlett Packard (HP-9000 série 300), qui effectue l'intégration des pics et le tracé des spectres ;
- une table traçante Hewlett Packard (HP 7440 A COLOR PRO) qui réalise des copies des chromatogrammes et des spectres ;
- une colonne C18 μ Bondapack (Waters) de 30 cm de longueur et de 3,9 mm de diamètre interne, remplie de particules de 5 μ m de diamètre ;
- une précolonne, du même type, de 5,5 cm de longueur et 3,9 mm de diamètre interne. Le volume de la boucle d'injection est de 10 μ l. Les solvants d'élution sont constitués par le méthanol pur et l'eau bidistillée ajustée à pH 2,6 avec l'acide orthophosphorique, puis filtrée sur millipore (0,45 μ m). Le programme de gradient de l'élution est défini dans le tableau 1.

Dosages HPLC des composés phénoliques

Pour séparer et quantifier les composés phénoliques, nous avons utilisé un équipement HPLC Waters modèle 510 muni d'un intégrateur Shimadzu, CR-3A Chrompack. La colonne employée est une Lichrospher 100 RP 18 (250 x 4,0 mm ; particules de 5 μ m de diamètre) pourvue d'une précolonne C18 (Waters) de 25 mm de longueur et de 3,9 mm de diamètre.

Les solvants d'élution sont constitués par l'acétonitrile et l'eau bidistillée ajustée à pH 2,6 avec l'acide orthophosphorique, puis filtrée sur millipore (0,45 μ m). La programmation de gradient est définie dans le tableau 1. Cette programmation ne permet pas de quantifier avec exactitude le gossypol qui se sépare, dans ces conditions en trois tautomères. En revanche, avec le mélange acétonitrile/eau dans la proportion 80/20 (vol/vol), on sépare, à 280 nm, en moins de 15 mn et en un pic unique, le gossypol ou le complexe de gossypol-acétique.

Les teneurs des composés phénoliques autres que le gossypol libre sont déterminées par étalonnage interne à

TABLEAU 1

Programmation de gradient, utilisée pour la séparation des composés phénoliques purifiés.

Programming of the gradient used for the separation of purified phenolic compounds.

Temps mn	Debit ml/min	Acétonitrile ou Méthanol %	Eau %
0	0,70	5	95
5	0,70	5	95
10	0,70	10	90
15	0,70	20	80
30	0,70	20	80
35	0,70	25	75
45	1,00	80	20
65	1,00	80	20

280 nm, longueur d'onde d'absorption maximale de la lumière pour tous les composés phénoliques. 10 μ l de chaque extrait sont mélangés à 10 μ l de l'étalon, puis analysés.

L'aire du pic de l'étalon est comparée à celle du pic inconnu. L'acide gallique, retenu comme étalon interne est bien séparé des autres pics. Son temps de rétention est de 9 mn.

Les teneurs en gossypol libre sont déterminées par étalonnage externe. L'aire du pic d'un extrait de gossypol libre est comparée à celle d'une solution témoin de gossypol-acétique de référence, analysée dans les mêmes conditions. Le facteur de conversion du complexe de gossypol-acétique en gossypol pur est de 0,896 (HOFFPAUER *et al.*, 1960). Cinq analyses sont effectuées pour chaque extrait.

Résultats et discussion

Identification des composés phénoliques extraits des amandes broyées

Comparaison spectrophotométrique des extraits hydroalcooliques totaux de composés phénoliques purifiés ou non

• Composés phénoliques bruts

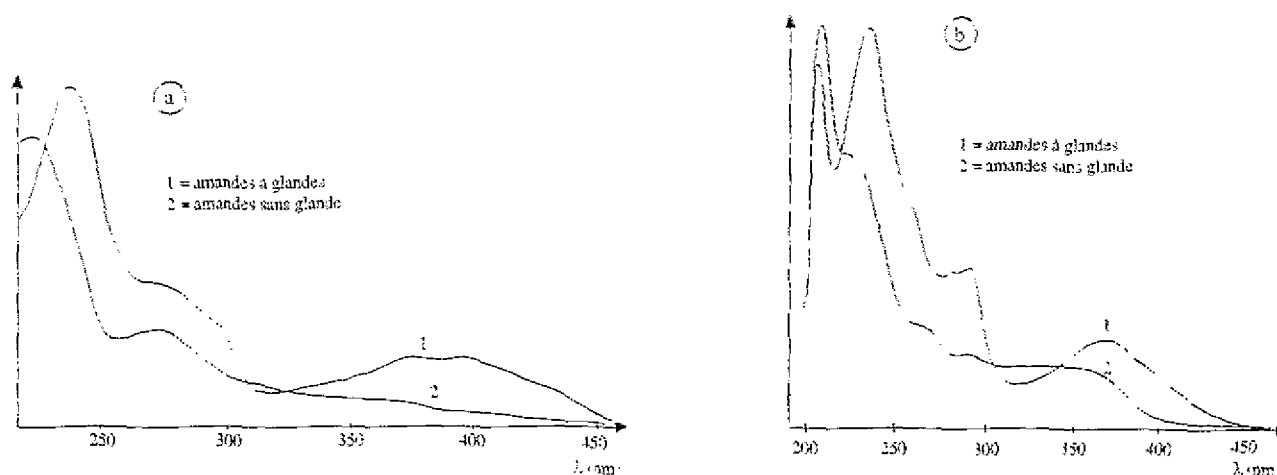
Le balayage depuis 200 nm jusqu'à 450 nm permet d'enregistrer les spectres des extraits hydroalcooliques totaux d'amandes de cotonniers avec ou sans glandes (fig. 2a).

Entre 200 et 250 nm, les deux spectres présentent des maxima nettement distincts. On note ensuite une similitude d'absorption entre 250 et 350 nm. L'extrait hydroalcoolique d'amandes de cotonniers à glandes montre un

maximum d'absorption entre 370 et 410 nm, alors que, dans la même région, celui d'amandes sans glande possède une plage d'absorption presque nulle.

• Composés phénoliques purifiés

Les spectres des extraits phénoliques purifiés d'amandes de cotonniers avec ou sans glandes (fig. 2b) montrent deux pics nettement distincts entre 200 et 240 nm, qui pourraient correspondre à des composés différents ou à des concentrations non identiques des mêmes composés. Le spectre de l'extrait de composés phénoliques d'amandes à glandes présente un épaulement bien prononcé à 290 nm qui serait dû à la fois au gossypol, aux acides phénoliques et aux flavonoïdes. Le maximum d'absorption à 370 nm caractérise la présence des noyaux naphthyls et des groupements aldéhydes du gossypol (ADAMS et KIRKPATRICK, 1938 ; BOATNER, 1948).

**Figure 2**

Spectres d'absorption des extraits hydroalcooliques de composés phénoliques d'amandes de cotonniers avec et sans glande : a) extrait bruts ; b) extraits purifiés.

Absorption spectra of water-alcohol extracts of phenolic compounds from glanded and glandless cotton seed kernels: a) raw extracts; b) purified extracts.

L'extrait phénolique purifié d'amandes sans glande absorbe entre 300 et 400 nm sous la forme d'une plage qui correspondrait à des terpénoïdes intermédiaires de la biosynthèse du gossypol (BELL et STIPANOVIC, 1977).

Chromatographie sur couche mince

La chromatographie bidimensionnelle sur couche mince permet non seulement la séparation de la plupart de composés phénoliques des amandes de cotonniers, mais aussi une approche de leur identification (fig. 3). Le gossypol, ses dérivés et les autres composés apparentés au gossypol se situent à un même emplacement sur les chromatoplaques, sur la ligne des dépôts (fig. 3, G pour les amandes à glandes et X pour les amandes sans glande). Ces taches ne migrent pas en seconde dimension, car ces composés forment avec l'acide acétique des complexes insolubles.

L'utilisation des différents révélateurs conduit à distinguer 6 grandes familles ou sous-groupes de composés phénoliques que leurs caractéristiques, rassemblées dans le tableau 2 permettent de classer en 3 grands groupes.

Groupe I : les flavonoïdes

Les fluorescences de ces composés avec les réactifs de Neu et de Benedikt permettent de les subdiviser en deux sous-groupes IA et IB.

Le sous-groupe IA est représenté par les composés qui perdent leur fluorescence (réaction +) avec le réactif de Benedikt et qui se colorent en jaune orange en présence du réactif de Neu.

L'ensemble de ces caractéristiques permet de les classer dans la famille des flavonols orthodiphénoliques qui sont des dérivés de la quercétine. Ce sont les composés Q1 à Q7 de la figure 3.

Le second sous-groupe, IB, intensément fluorescent avec le réactif de Benedikt (réaction -), est jaune vert en présence du réactif de Neu. Ces caractéristiques permettent de classer ces composés dans la famille des flavonols monophénoliques qui sont des dérivés du kaempférol (composés K1 à K5, fig. 3).

La vaniline à 1 % dans l'HCl 12N, destinée à révéler les flavanes ne détecte aucun de ces composés sur les chromatoplaques.

Groupe II : les acides phénoliques

Ils sont subdivisés en deux sous-groupes IIA et IIB selon leurs teintes de fluorescences en UV. Tous ces composés donnent des réactions (-) (gain de fluorescence à 366 nm) avec le réactif de Benedikt, ce qui indique la présence des monophénols constitués par les dérivés para-coumariques (PC) (groupe IIA) et féruliques (F) (groupe IIB), (tabl. 2 et fig. 3).

Les dérivés para-coumariques se colorent en violet devenant intense avec le réactif de Benedikt. Les dérivés d'acide férulique (F) sont bleus ou bleu vert, devenant intenses avec le réactif de Benedikt.

Groupe III : le gossypol et ses dérivés (variétés à glandes) et autres composés apparentés au gossypol (variétés sans glande)

Ce sont des composés qui ne migrent pas en seconde dimension en CCM : le gossypol et ses dérivés (G) et les autres composés apparentés au gossypol (X), (tabl. 2 et fig. 3).

Les composés G sont jaunes, visibles à l'œil nu. Cette couleur est intense et très peu fluorescente avec tous les réactifs. Ces composés pourraient être constitués par les différentes formes tautomériques du gossypol et par des

TABLEAU 2

Caractéristiques chromatographiques (CCM) des différents composés phénoliques identifiés.
Chromatographic characteristics (TLC) of the different phenolic compounds identified.

Désignation des composés	Réactifs utilisés					Rf 2 ^e dimension		Familles de composés	Sous-groupes	Groupes
	UV	NH ₃	Benedikt	Neu	AlCl ₃	Variétés sans glande	Variétés à glandes			
Q1	J.g.	J.g.	+	J.or.	J.	0,14	0,14	Dérivés de la quercétine (Q)	IA	I Flavonoïdes
Q2	J.g.	J.g.	+	J.or.	J.	0,18	0,20			
Q3	J.g.	J.g.	+	J.or.	J.	0,37	0,33			
Q4	J.g.	J.g.	+	J.or.	J.	0,42	0,38			
Q5	J.g.	J.g.	+	J.or.	J.	0,49	0,53			
Q6	J.g.	J.g.	+	J.or.	J.	0,65	0,67			
Q7	J.g.	J.g.	+	J.or.	J.	0,42	0,42			
K1	J.ve.	J.ve.	-	J.ve.	J.	0,15	0,17	Dérivés de kaempférol (K)	IB	I Flavonoïdes
K2	J.ve.	J.ve.	-	J.ve.	J.	0,50	0,47			
K3	J.ve.	J.ve.	-	J.ve.	J.	0,53	0,59			
K4	J.ve.	J.ve.	-	J.ve.	J.	0,65	0,67			
K5	J.ve.	J.ve.	-	J.ve.	J.	0,45	0,47			
PC1		Vi.	-			0,68	0,70	Dérivés de l'acide paracoumarique (PC)	IIA	II Acides phénoliques
PC2		Vi.	-			0,92	0,90			
PC3	Vi.	Vi.	-			0,18	0,20			
PC4		Vi.	-			0,92	0,90			
PC5		Vi.	-			0,77	0,77			
PC6		Vi.	-			0,90	0,91			
PC7		Vi.	-			0,90	0,88			
F1	B.	B.	-			0,69	0,67	Dérivés de l'acide férulique (F)	IIB	II Acides phénoliques
F2		B.	-			0,84	0,83			
F3		B.ve.	-			0,65	0,63			
F4		B.ve.	-			0,84	0,86			
F5		B.	-			0,70	0,72			
F6		B.	-			0,89	0,90			
G								Gossypol et ses dérivés	G	III Gossypol composés voisins
Variété à glandes	J.	J.f.	+	J.f.	J.f.		0			
X								Composés autre que le gossypol	X	III Gossypol composés voisins
et Variété sans glande	Or.	Or.	+	Or.			0			

J. : jaune
 J. or. : jaune-orange
 J. f. : jaune foncé
 J.g. : jaune gris
 J. ve. : jaune vert
 - : gain de fluorescence
 + : perte de fluorescence

Or. : orange
 Vi. : violet
 B. : bleu
 B.ve. : bleu vert

J. : yellow
 J.or. : yellow-orange
 J.f. : dark yellow
 J.g. : yellow-green
 J.ve. : yellow-gray
 - : increase in fluorescence
 + : decrease in fluorescence

Or. : orange
 Vi. : violet
 B. : blue
 B.ve. : blue-green

dérivés terpénoïdes mis en évidence dans les glandes par BELL et STIPANOVIC, (1977).

La famille des composés X est très peu visible à l'œil nu. Elle forme cependant des complexes orange très fluorescents avec les réactifs de Neu, de Benedikt, le chlorure d'aluminium et les vapeurs d'ammoniaque.

Ces caractéristiques ne permettent pas de la situer parmi les composés identifiés plus haut. Elle pourrait regrouper certains terpénoïdes voisins du gossypol.

L'HPLC munie d'un détecteur à barrettes de diode

L'HPLC utilisant un détecteur à barrettes de diode permet d'obtenir les chromatogrammes d'un extrait de composés phénoliques purifiés d'amandes sans glande respectivement à 280 nm (fig. 4a) et à 360 nm (fig. 4b). A 280 nm, les acides phénoliques forment les pics 1 à 7, pour des temps de rétention compris entre 34 et 36 mn. De 36 à 39 mn, les pics 8 à 19 représentent essentiellement des flavonoïdes. Au-delà du pic 19, on n'observe plus aucun pic important.

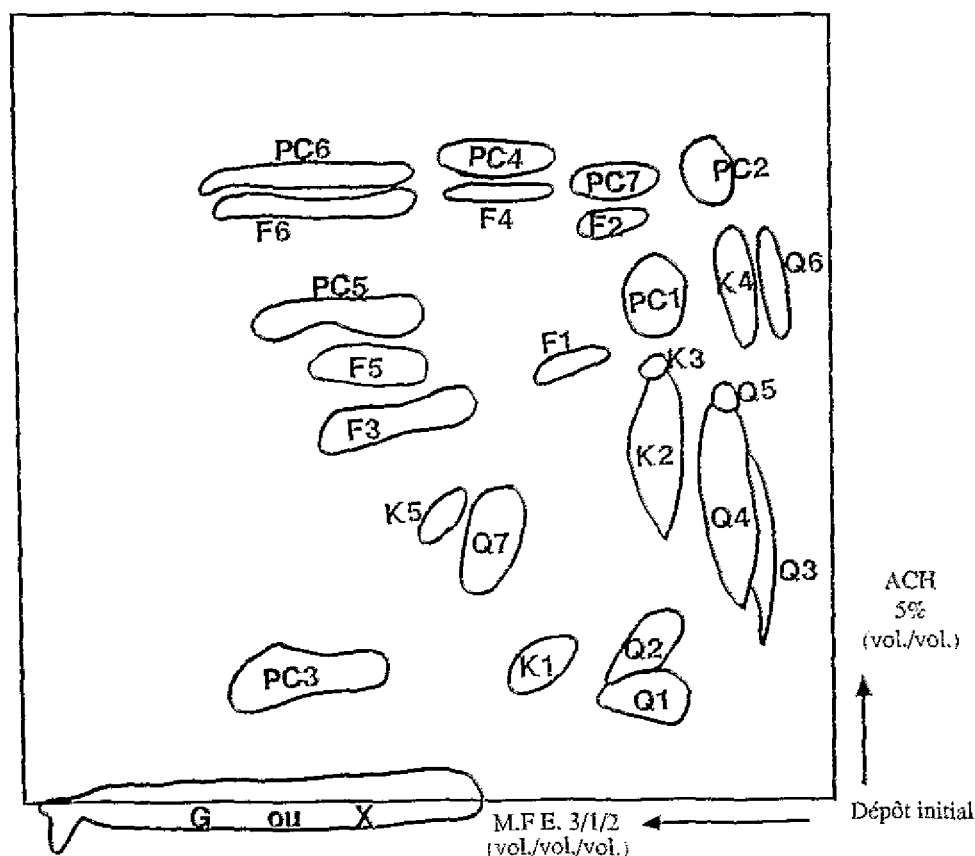


Figure 3

Chromatogramme récapitulatif des différents composés phénoliques présents dans les amandes de cotonniers. (CCM).

Recapitulative chromatogram of the different phenolic compounds in cotton seed kernels (TLC).

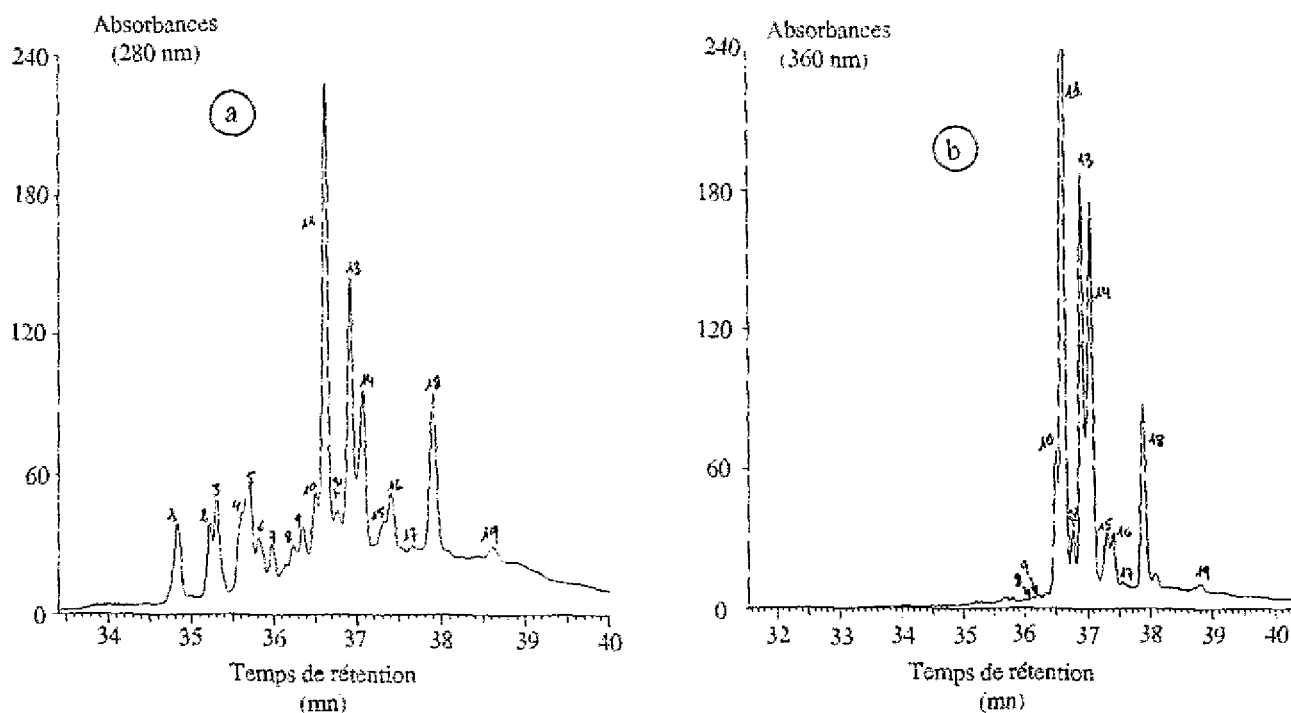


Figure 4

Chromatogrammes HPLC, respectivement à 280 nm (a) et 360 nm (b), d'un extrait purifié de composés phénoliques d'amandes de cotonniers sans gossypol, obtenus avec un détecteur à barrettes de diode.

HPLC chromatograms obtained with a diode array detector at 280 nm (a) and 360 nm (b) of a purified extract of phenolic compounds from glandless cotton seed kernels.

La même analyse effectuée sur un extrait d'amandes à glandes (fig. 6) montre, qu'au-delà du pic 19, se situent les pics du gossypol et de ses dérivés. A cette différence près, les chromatogrammes obtenus sont identiques. C'est la raison pour laquelle nous ne présentons ici que les chromatogrammes correspondant à l'extrait d'amandes sans glande.

A 360 nm, seuls les flavonoïdes sont identifiables (fig. 4b).

L'utilisation d'un détecteur à barrettes de diode permet, à l'aide de l'ordinateur de tracer séparément le spectre de chaque pic. Les figures 5a et 5b regroupent les spectres des pics 1 à 7 qui correspondent aux acides phénoliques. Les figures 5c à 5g représentent les flavonoïdes. Les maxima et minima d'absorption relevés conduisent par conséquent, d'après les données fournies par RIBEREAU-GAYON (1968) et MARBRY *et al.* (1970), à les différencier en deux groupes de composés (tabl. 3).

TABLEAU 3

Caractérisations spectrales, correspondances CCM, et proposition d'identification de quelques composés séparés par HPLC.

Spectral characterization, TLC correspondence and proposal for the identification of several compounds separated by HPLC.

Tache CCM d'après fig. 3	N° pics HPLC d'après fig. 4a	Absorption (nm)		Identification proposée
		Maxima	Minima	
-	1	250 ; (280)	-	Composé X
PC1 - PC2	2	240 ; 290 ; 320	260 ; 305	Dérivés hydroxycinnamiques
	3	240 ; 295 ; 315	260 ; 300	
	4	245 ; 275 à 315	255	
	5	240 ; 275 à 315	255	
F5	6	240 ; 275 ; (320)	-	(acides phénoliques)
PC7	7	240 ; 275 ; (320)	-	
Q6	8	235 ; 262,5 ; 324,5	250 ; 295	
K4	9	235 ; 262,5 ; 316	250 ; 295	
Q ₁ Q ₄ Q ₅	10	255 ; 357,5	240 ; 280	→ (Rutine) Flavonoïdes
	11	255 ; 357,5	240 ; 280	
	12	266 ; 357,5	250 ; 280	
K ₁ K ₂	13	265 ; 352,5	240 ; 282,5	
	14	255 ; 357,5	240 ; 282,5	
-	15	267,5 ; 355	252,5 ; 282,5	
-	16	267 ; 355	255 ; 280	
Q ₁ Q ₂	17	242,5 ; 370	230 ; 310	→ (Quercétine)
	18	255 ; 287,5 ; 380	320	
-	19	265 ; 380	320	

Les valeurs entre parenthèses désignent les épaulements

PC = dérivés P-coumariques ;

Q = dérivés de quercétine ;

F = dérivés féruliques ;

K = dérivés de kaempférol.

Values in brackets are for the shoulders

PC, P-coumaric derivatives;

Q, quercetin derivatives.

F, ferulic derivatives;

K, kaempferol derivatives.

Il s'agit des dérivés d'acides phénoliques (principalement les hydroxycinnamiques) et des flavonoïdes. Ces résultats confirment ceux obtenus par chromatographie sur couche mince. En effet, certains de ces composés correspondent aux taches identifiées sur les chromatogrammes (fig. 3).

D'autres composés (PC3 à PC6, F1, F2, F3, F4, F6, Q7, K3, K5) (fig. 3) n'ont pas pu être caractérisés à cause de

leurs très faibles concentrations. Ils ne sont pas détectables par HPLC.

Si l'on injecte la rutine et la quercétine pures dans le chromatographe HPLC, on constate que leurs temps de rétention correspondent à ceux des pics 11 et 18 (fig. 4a).

Par conséquent, ces substances seraient présentes dans nos extraits. L'utilisation d'autres témoins ne nous a pas permis d'identifier d'autres dérivés hydroxycinnamiques.

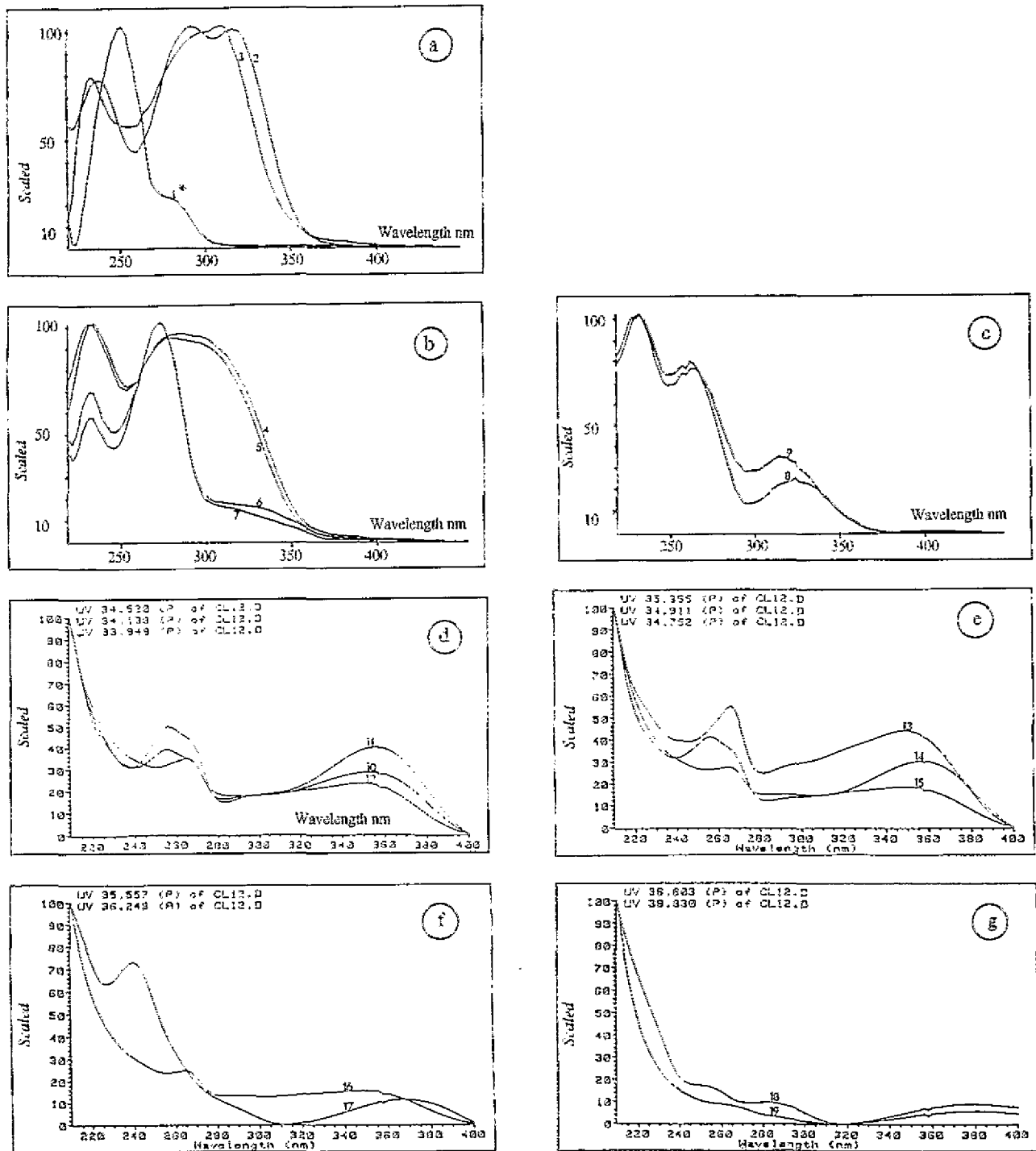


Figure 5

Specres d'absorption obtenus avec un detecteur à barettes de diode des différents composés phénoliques qui sont communs aux deux types d'amandes de cotonniers.

* Les numéros des spectres correspondent à ceux indiqués sur les différents pics de la figure 4a.

Absorption spectra (obtained with a diode array detector) of the various phenolic compounds which are common to both types of cotton seed kernel.

* *Spectrum numbers are as shown on the various peaks in figure 4a.*

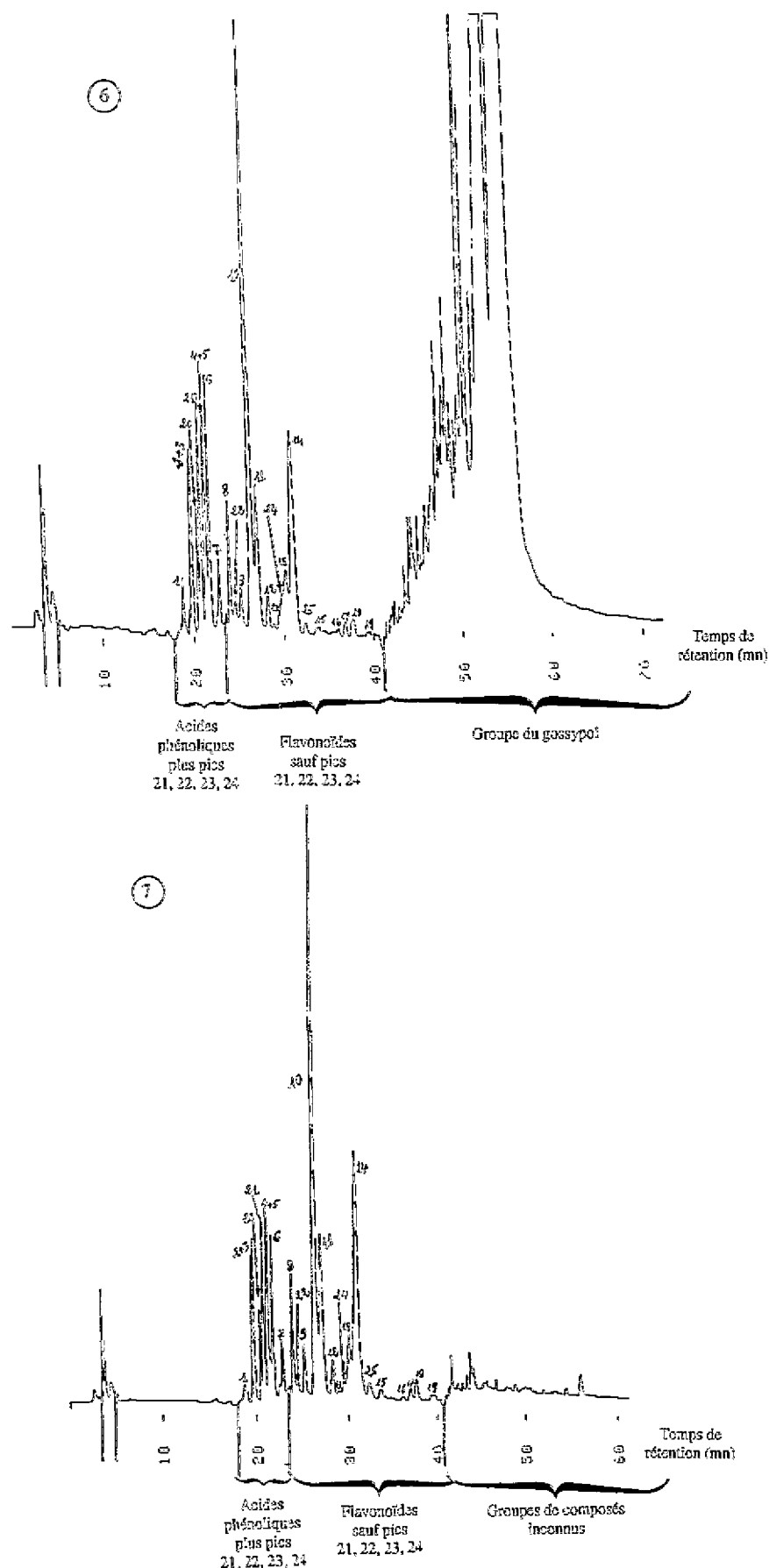


Figure 6 et 7

Chromatogramme HPLC à 280 nm d'un extrait purifié de composés phénoliques d'amandes de cotonnier avec glandes (fig. 6) ou sans glande (fig. 7), obtenu avec un détecteur UV/visible simple.

Les numérotations sont identiques à celles de la figure 4a.

HPLC chromatogram at 280 nm of a purified extract of phenolic compounds from glanded cotton seed kernels (Figure 6) and from glandless kernels (Figure 7) obtained with a UV/visible wavelength detector.

Numbering as in Figure 4a.

L'HPLC muni d'un détecteur à barrettes de diode a permis ainsi de caractériser 12 dérivés de flavonoïdes et 7 dérivés d'acides phénoliques (tabl. 3).

Dosage des composés phénoliques par HPLC

Les figures 6 et 7 montrent les chromatogrammes enregistrés à 280 nm des extraits purifiés de composés phénoliques d'amandes, respectivement avec et sans glandes à pigments. Comme nous l'avons remarqué plus haut, l'allure générale des chromatogrammes est identique quel que soit le type de cotonnier considéré. Seul le gossypol et les composés apparentés les différencient (fig. 6). Ils sont représentés par les pics au-delà du pic 19. Dans cette zone du chromatogramme, on dénombre au moins 16 pics différents, précédant deux pics majeurs qui seraient deux des trois tautomères du gossypol.

Les acides phénoliques qui regroupent une dizaine de pics ont, pour la plupart, des temps de rétention plus faibles que ceux des flavonoïdes qui forment des pics beaucoup plus importants. Par rapport à la détection à barrettes de

diode qui est plus sélective, on dénombre des pics de composés de moindre importance.

Les teneurs en composés phénoliques des amandes broyées de cotonniers à glandes (Pavlikéni et Giza 75) ou sans glande (BC4 et F281), ainsi que les teneurs et pourcentages relatifs de chacune des familles de composés phénoliques sont rassemblés dans le tableau 4.

Les amandes des variétés à glandes présentent des teneurs en composés phénoliques plus élevées que celles sans glande, à cause de la présence du gossypol libre et de teneurs pratiquement identiques en flavonoïdes. On note la proportion considérable du gossypol par rapport aux autres composés phénoliques.

Dans les amandes des variétés sans glande, les flavonoïdes constituent la fraction principale devant les acides phénoliques. Quelle que soit la variété considérée, les pourcentages relatifs en flavonoïdes et en acides phénoliques sont comparables entre eux.

TABLEAU 4

Détermination par HPLC des sommes de composés phénoliques (mg/100 g m.s.), teneurs et pourcentages relatifs de chaque groupe de composés phénoliques contenus dans les amandes de cotonniers avec ou sans glande.

HPLC determination of sums of phenolic compounds (mg/100g dry weight) and relative contents and percentages of each group in glanded and glandless cotton seed kernels.

Cotonniers		Sommes des teneurs en composés phénoliques mg/100g m.s.	Flavonoïdes		Acides phénoliques		Gossypol libre	
			Teneurs mg/100g m.s.	% relatifs	Teneurs mg/100g m.s.	% relatifs	Teneurs mg/100g m.s.	% relatifs
Variétés à glandes	Pavlikéni	1127,83	66,90	5,93	62,21	5,51	998,72	88,55
	Giza 75	1089,17	65,16	5,98	42,69	3,92	981,32	90,10
Variétés sans glande	BC4	123,53	70,45	57,97	51,08	42,03	0	0
	F-281	70,02	42,09	60,11	27,93	39,88	0	0

Conclusion

Les substances phénoliques d'amandes de cotonniers sont essentiellement constituées par les dérivés des acides phénoliques, les flavonoïdes et le gossypol et substances apparentées pour les variétés à glandes. Les acides phénoliques sont représentés par les dérivés d'acides cinnamiques, essentiellement les acides p-coumarique et ferulique.

Toutefois, dans les extraits d'amandes des variétés de cotonniers étudiées, nous n'avons pas noté la présence de dérivés d'acide caféique (MAGA et LORENZ, 1974 ; DABROWSKI et SOSULSKI, 1984), ni celle des dérivés

d'acides chlorogénique, sinapique, syringique, gentisique, vanillique, salicylique, protocatéchique décrits par MAGA et LORENZ (1974) dans les amandes de cotonniers à glandes.

Les flavonoïdes sont représentés par les flavonols, constitués essentiellement par des dérivés de quercétine et de kaempférol. Par HPLC, nous avons caractérisé 12 flavonoïdes majeurs dont certains seraient voisins de ceux déjà identifiés dans les amandes sans glande par BLOUIN *et al.* (1981), à savoir : l'isoquercitrine, la rutine, le robinoside 3-O quercétol, le néohesperidoside 3-O quercétol, le

néohespéridoside 3-O kaempférol, le glucoglucoside 3-O quercétol et le glucoglucoside 3-O kaempférol.

PRATT et WENDER (1959, 1961) signalent également la présence, dans les amandes de cotonniers, de la rutine, l'isoquercitrine, le rhamnoglucoside 3-O kaempférol, le glucoglucoside 3-O quercétol qui sont aussi semblables à ceux que nous avons caractérisés.

Le gossypol n'existe que dans les cotonniers à glandes.

Les amandes à glandes renferment plus de composés phénoliques que les amandes sans glande, à cause de la présence du gossypol.

Les différentes familles de composés phénoliques solubles des amandes de cotonniers avec ou sans glande sont donc comparables entre elles, en dehors de la présence du gossypol et de ses dérivés caractéristiques des cotonniers à glandes.

Références bibliographiques

- AOCS, 1953. - Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Society, Chicago, Illinois, edited by SALLEE E.M., The Procter and Gamble Cie, Cincinnati, Ohio.
- ADAMS R., KIRKPATRICK E.C., 1933. - Structure of gossypol: XI. Absorption spectra of gossypol, its derivatives and of certain dinaphthalene compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, 60, 2, 2180-2184.
- BELL A.A., STIPANOVIC R.D., 1977. - The chemical composition, biological activity and genetics of pigment glands in cotton. *Beltwide Cotton Production Research Conferences Proceedings, January 10-12, Atlanta, Memphis*, 244-253.
- BLOUTIN F.A., ZARINS Z.M., CHERRY J.P., 1981. - Role of flavonoids in the production of color in biscuits prepared with wheat and cottonseed flours. *J. Food Sci.*, 45, 953-961.
- BOATNER C.H., 1948. - Pigments of cottonseed in Cottonseed and cottonseed products, their chemistry and chemical technology», Bailey, E. A., Interscience publishers, New York.
- CRAIG W.M., BRODERICK G.A., 1981. - Effect of heat treatment on true digestibility in rat: in-vitro proteolysis and available lysine content of cottonseed meal protein. *J. Anim. Sci.*, 52, 2, 292-301.
- DABROWSKI K.J., SOSULSKI F.W., 1984. - Composition of free and hydrolysable phenolic acids in defatted of ten oilseeds. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 1, 123-130.
- FLEURIET A., MACHEIX J.J., 1972. - Séparation et dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide chlorogénique et des catéchines des fruits. *J. Chromatogr.*, 74, 339-345.
- HOFFPAUIR C.L., HARRIS J.A. and HUGHES J.P., 1960 - Gossypol acetic acid as a reference standard in the determination of gossypol. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 43, 2, 329-331.
- HOSTETTMANN K., DOMON B., SCHAUFELBERGER D., HOSTETTMANN M., 1984. - On line High Performance Liquid Chromatography, Ultraviolet-visible spectroscopy of phenolic compounds in plant extracts using post column derivation. *J. Chromatogr.*, 283, 137-147.
- HOSTETTMANN K., 1985. - Recent advance in methodology for isolation and purification of plant phenolics. In *The biochemistry of plant phenolics. The annual proceeding of phytochemical society of the Europ.* Ed. Van Sumere C.F. et LEA P.J., Clarendon Press, Oxford, 25, 1-16.
- MACHEIX J.J., 1974. - Les esters hydroxycinnamiques de la pomme : identification, variation au cours de la croissance du fruit et du métabolisme. *Thèse Doctorat d'état ès Sciences Naturelles, Université Paris VI*.
- MAGA J.A., LORENZ K., 1974. - Gas-liquid chromatography separation of the free phenolic acid fractions in various oilseed protein sources. *J. Sci. Food Agric.*, 25, 797-802.
- MARBRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B., 1970. - The systematic identification of flavonoids. *Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New-York*.
- NEU R., 1956. - Ein neues reagenz zum nachweis und zur unterscheidung von flavonen im papierchromatogramm. *Die Naturwissenschaften*, 43, 82.
- PONS W.A., GUTHRIE J.D., 1949. - Determination of free gossypol in cottonseed materials. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 26, 671-676.
- PRATT C., WENDER S.H., 1959. - Identification of rutin and isoquercitrin in cottonseed. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 36, 392-394.
- PRATT C., WENDER S.H., 1961. - Identification of kaempferol 3-rhamnoglucoside and quercetine-3-glucoside in cottonseed. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 38, 3, 403-404.

REZNIK H., EGGER K., 1961. - Benedikts reagents als indicators für phenolische ortho-dihydroxygruppen. *Z. Anal. Chem.*, 183, 196-199.

RIBEREAU GAYON P., 1968. - Plant phenolics. *Published by Oliver and Boys, Edinburg.*

SIEWEK F., GALENSA R., 1984. - High-performance liquid chromatographic determination of the degree of glycosylation of flavonols by use of ultra-violet diode array detector. *J. Chromatogr.*, 294, 385-389.

STAHL E., 1965. - Thin-layer chromatography. A laboratory hand book. *Springer-Verlag, New-york.*

TCHIEGANG C., 1989. - Etude des composés phénoliques des amandes des graines de cotonniers dans l'optique de la détoxification et de l'utilisation alimentaire des amandes et de leurs dérivés. *These Doctorat, U.S.T.L., Montpellier, France.*

Chromatographic analysis of phenolic compounds in cotton seed kernels (*Gossypium hirsutum* L. and *G. Barbadense* L.)*

C. Tchiegang and J. Bourély

Summary

Thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) combined with UV visible spectrophotometry with a diode array detector have shown that the phenolic compounds in cotton seed kernels are flavonoids (derived from quercetol and kaempferol) and phenolic acids (para-coumaric and ferulic derivatives) in glandless varieties (without gossypol

glands) together with gossypol in kernels of glanded varieties. In the latter type, gossypol is the major phenolic compound, followed by flavonoids and phenolic acids. Flavonoids dominate over phenolic acids in seeds from glandless plants. The phenolics concentration is lower in glandless varieties.

KEY WORDS: *Gossypium*, kernels, phenolic compounds, chromatography (TLC and HPLC).

Introduction

Phenolic compounds are widespread in plants and play an essentially metabolic role. They are natural substances and are generating increasing interest because of their effects on the nutritional quality, taste and colour of foodstuffs. Cotton seed kernels contain a major phenolic compound, gossypol, which is toxic for man and animals (especially monogastric species). The substance is neither a phenolic acid nor a flavonoid. Although much research has been carried out on gossypol - from synthesis to pharmaceutical uses - the other phenolic compounds of cotton seed kernels have received little attention. MAGA and LORENZ (1974) and DABROWSKY and SOSULSKI (1984) used gas chromatography (GC) to identify the following phenolic acids in cotton seed kernels: chlorogenic, caffeic, sinapic, coumaric, vanillic, protocatechuic,

ferulic and salicylic acids. BLOUIN *et al.* (1981) used thin layer chromatography (TLC) to show that flavonoids were represented by quercetol and kaempferol derivatives. More recently, HPLC combined with UV/visible spectrophotometry with a diode array detector has been used to separate and characterize phenolic compounds (flavonoids and xanthenes) by their UV spectra in *Gentiana* sp. (HOSTETTMANN *et al.*, 1984; HOSTETTMANN, 1985; SIEWEK and GALENSA, 1984).

The purpose of the work described here is to characterize phenolic compounds in cotton seed kernel by thin layer chromatography and by HPLC with a diode array detector and to evaluate their levels using HPLC.

* The first part of a doctoral thesis defended on January 31 1989 at Université des Sciences et Techniques du Languedoc (U.S.T.L., Montpellier), by Mr C. Tchiegang on "Study of phenolic compounds in cotton seeds with a view to the detoxification and use as a foodstuff of kernels and derivatives".

Material and methods

Samples

The kernels of four varieties of cotton were investigated. Three belonged to the species *Gossypium hirsutum* L. These were the Bulgarian glanded variety Pavlikéni tested in Montpellier, BC4, a glandless variety cultivated in Côte d'Ivoire and F281, another glandless variety bred in Chad. The fourth, glanded variety was Giza 75, a *Gossypium barbadense* L. cultivar grown in Egypt.

Seed cotton from the harvest was separated into fibre and seeds. The latter were delinted with sulphuric acid and hulled with a small laboratory machine to recover the kernels.

Extraction of phenolic compounds

The procedure used was described by FLEURIET and MACHEIX (1972). 4 g of kernels was crushed in a mortar and then agitated with 100 ml ethanol 30%, cold, for 45 min (Figure 1). The preparation was filtered and the solid residue extracted four times with the same solvent. The water-alcohol extract obtained contained numerous non-phenolic substances (lipids, pigments, sugars, organic acids, etc.). These were discarded by evaporating the ethanol under a vacuum at 40°C and liposoluble substances were removed by washing the aqueous extract 5 times with the same volume of distilled hexane.

The phenolic compounds in the lipid-free, bleached extract were extracted five times with the same volume of ethyl acetate after acidification and increasing the ionic force by adding metaphosphoric acid and ammonium sulphate (FLEURIET and MACHEIX, 1972; MACHEIX, 1974). The different phenolic compound fractions were pooled, evaporated at 40°C and recovered with pure methanol to form the final methanolic extract (Figure 1).

It is noted that part of the gossypol is removed with the lipids during lipid removal from glanded kernels with hexane.

The AOCS colorimetric method Ba 7-58 showed that approximately 72% of the gossypol in raw extract of phenolic compounds was lost. This makes it impossible to determine the free gossypol content at the same time as the other phenolic compounds.

Free gossypol was extracted with aqueous acetone 70% (PONS and GUTHRIE, 1949), the solvent recommended in the official AOCS Ba 7-58 method (1958). This gossypol extract was prepared for HPLC by evaporating the acetone and resuspending the residue of free gossypol in a 95/5 (vol/vol) mixture of pure methanol and diethyl ether (TCHIEGANG, 1989).

Methods used to characterize phenolic compounds

UV/visible spectrophotometry

The spectra of raw or purified water-alcohol extracts of phenolic compounds were recorded from 200 to 450 nm with Perkin-Elmer 551 spectrophotometer equipped with a Perkin-Elmer 56 recorder.

Thin layer chromatography

• Separation of phenolic compounds

Merck aluminium plates (20 x 20 cm) covered with a 0.1 mm layer of cellulose were used with no fluorescence indicator. Ascending two-dimensional chromatography was used with the upper phase of the mixture of methyl isobutyl ketone/formic acid/water (MFW) in the proportions 3/1/2 (vol/vol) as the first dimension and 5% glacial acetic acid in distilled water as the second dimension.

• Chemical visualization of chromatoplates

A number of phenolic compounds are naturally coloured (flavonoids, gossypol). Chemical reagents are required to visualize the others on the plates, and the following methods were used:

- UV light at 254 and 366 nm in the absence or presence of ammonia vapour (to which most phenolic compounds are sensitive);
- liquid nitrogen. This enhances fluorescence in many phenolic compounds at 254 nm (RIBEREAU-GAYON, 1968);
- dinitrogen para-nitroaniline prepared according to SWAIN's procedure described by RIBEREAU-GAYON (1968);
- 1% ferric chloride in distilled water although the compound is not specific to phenolic functions (RIBEREAU-GAYON, 1968);
- Benedict reagent (REZNIK and EGGER, 1961) which enables visualization under UV light of compounds with a free o-diphenol group. Those which do not possess such a group are defined as hydroxycinnamic monophenols;
- 1% aluminium chloride in ethanol (STAHL, 1965; RIBEREAU-GAYON, 1968) which confirms the presence of flavonoids and makes them fluorescent orange under UV light;
- NEU's reagent (1956), which detects monophenol or diphenol flavonoids under UV light at 366 nm;
- 1% vanillin in HCl 12N, which detects most flavan-3-ols.

Characterization of phenolic compounds by high performance liquid chromatography

The absorption spectrum of HPLC with a diode array UV/visible light spectrophotometer enables each separate

peak to be characterized. First, the chromatograms of phenolic extracts are plotted at 280 or 360 nm to individualize each phenolic compound by a peak. Scanning at between 200 and 400 nm with the diode array then gives the spectrum of each separate compound.

The following apparatus was used:

- HPLC Varian 5000 chromatograph fitted with a Hewlett Packard diode array detector (HP-1040M);
- a Hewlett Packard computer (HP-9000 series 300) to integrate peaks and plot spectra;
- a Hewlett Packard plotter (HP 7440A COLOR PRO) to make copies of chromatograms and spectra;
- a C18 μ Bondapak column (Waters) 30 cm long, internal diameter 3.9 mm, filled with particles 5 μ m in diameter;
- a precolumn of the same type, 5.5 cm long, internal diameter 3.9 mm. Sampling valve volume was 10 μ l. Elution solvents were pure methanol and bidistilled water adjusted to pH 2.6 with orthophosphoric acid and filtered on millipore (0.45 μ m). Elution gradient programming is shown in Table 1.

HPLC determination of phenolic compounds

Water model 510 HPLC apparatus equipped with a Shimadzu CR-3A Chrompack integrator was used to separate and quantify the phenolic compounds. A Lichrospher 100 RP 18 column (250 \times 4.0 mm; 5 μ m diameter

particles) was used; it was fitted with a Waters C18 precolumn 25 mm long and 3.9 mm in diameter.

The elution solvents were acetonitrile and bidistilled water adjusted to pH 2.6 with orthophosphoric acid and filtered on millipore (0.45 μ m). Gradient programming is shown in Table 1. Gossypol, which separated into three tautomers, was not accurately quantified by this method. However, a mixture of 80/20 (v/v) acetonitrile/water separated gossypol or the gossypol-acetic acid complex at 280 nm in less than 15 min in a single peak.

The levels of phenolic compounds other than free gossypol were measured by internal calibration at 280 nm at which all the phenolic compounds are absorbed. 10 μ l of each extract was mixed with 10 μ l of the standard and then analysed.

The peak area of the standard was compared with that of the unknown peak. Gallic acid was used as internal standard and separated well from the other peaks. Its retention time was 9 min.

Free gossypol contents were determined using an external standard. The area of the free gossypol peak was compared with that of a control solution of gossypol-acetic acid analysed under the same conditions. A factor of 0.896 was used to convert gossypol-acetic acid into pure gossypol (HOFFPAUER *et al.*, 1960). Five analyses were carried out for each extract.

Results and discussion

Identification of the phenolic compounds extracted from crushed kernels

Spectrophotometric comparison of total water-alcohol extracts of purified or unpurified phenolic compounds

• Raw phenolic compounds

The spectra of the total water-alcohol extracts of glanded and glandless cotton seed kernels were detected from 200 nm to 450 nm (Figure 2a). Between 200 and 250 nm, the spectra displayed clearly distinct maxima. Absorption was then similar from 250 to 350 nm. There was an absorption maximum for water-alcohol extract of glanded cotton seed kernels between 370 and 410 nm whereas the extract of glandless cotton seed kernels displayed a practically null field of absorption.

• Purified phenolic compounds

The spectra of purified extracts of glanded or glandless cotton seed kernels (Figure 2b) show two distinct peaks between 200 and 250 nm which may represent different compounds or different concentrations of the same compounds. The spectrum of purified extract of glanded cotton seed kernels has a pronounced shoulder at 290 nm prob-

ably caused by gossypol, phenolic acids and flavonoids. Maximum absorption at 370 nm shows that naphthyl nuclei and gossypol aldehyde groups are present (ADAMS and KIRKPATRICK, 1938; BOATNER, 1948).

The purified extract of glandless cotton seed kernels absorbed 300 to 400 nm in the form of an area which probably corresponds to intermediate terpenoids in gossypol biosynthesis (BELL and STIPANOVIC, 1977).

Thin layer chromatography

Two-dimensional thin layer chromatography both separates most of the phenolic compounds in cotton seed kernels and can be used to approach their identification (Figure 3). Gossypol, its derivatives and related compounds are in the same place on the chromatoplates on the starting point line (Figure 3, G for glanded kernels and X for glandless). The spots did not migrate in the second dimension since these compounds form insoluble complexes with acetic acid.

Use of different indicators led to identifying six large families or subgroups of phenolic compounds. Their characteristics are shown in Table 2 and can be classified in 3 main groups.

Group I: flavonoids

These compounds can be divided into subgroups IA and IB on the basis of their fluorescence with Neu's reagent and Benedict solution. Subgroup IA consists of components which lose their fluorescence (+ reaction) with Benedict solution and which are stained yellow-orange by Neu's reaction.

These features mean that they can be classified in the orthodiphenolic flavanol family. These are quercetin derivatives and are labelled Q1 to Q7 in Figure 3.

The second subgroup, IB, was intensively fluorescent with Benedict solution (- reaction) and yellow-green in the presence of Neu's reagent. These features mean that these compounds can be classified in the monophenolic flavanol family, which consists of kaempferol derivatives (compounds K1 to K5, Figure 3).

No flavans were detected on the chromatoplates by 1% vanillin in HCl 12N.

Group II: phenolic acids

These were separated into subgroups IIA and IIB according to their UV fluorescence colour. All these compounds reacted (-) (increase in fluorescence at 366 nm) with Benedict solution, indicating the presence of monophenols; these were para-coumaric (PC) (group IIA) and ferulic (F) (group IIB) derivatives (Table 2 and Figure 3).

Para-coumaric derivatives were stained violet, which becomes intense, by Benedict solution.

Ferulic acid derivatives (F) were blue or blue-green, becoming intense with Benedict reagent.

Group III: gossypol and its derivatives (glanded cottons) and other compounds related to gossypol (glandless varieties)

These are compounds which do not migrate in the second dimension in TLC: gossypol and its derivatives (G) and other gossypol-related compounds (Table 2 and Figure 3).

G compounds were yellow and visible to the naked eye. The colour was intense and displayed little fluorescence with all the reagents. These compounds may be different tautomeric forms of gossypol and terpenoid derivatives revealed in gossypol glands by BELL and STIPANOVIC (1977).

The X family of compounds is hard to see with the naked eye. However, it forms very fluorescent orange complexes with Neu's reagent, Benedict solution, aluminium chloride and ammonia vapour. These characteristics cannot class it with the compounds identified above but it may include certain terpenoids which are close to gossypol.

HPLC with a diode array detector

HPLC with a diode array detector gives chromatograms of an extract of purified phenolic compounds from glandless kernels at 280 nm (Figure 4a) and 360 nm (Figure 4b). At 280 nm, phenolic acids formed peaks 1 to 7 with retention times of between 3.4 and 36 min. From 36 to 39 min, peaks 8 to 19 mainly represent flavonoids. There are no large peaks after peak 19.

The same analysis carried out on an extract of glanded kernels (Figure 6) showed that gossypol and gossypol derivative peaks were beyond peak 19. This was the only difference between the chromatograms and the reason why only chromatograms for the glandless kernel extract are shown here. Only flavonoids were identifiable at 360 nm (Figure 4b).

The diode array detector and the computer were used to plot the spectrum of each peak separately. Figures 5a and 5b group spectra 1 to 7 which are for phenolic acids. Figures 5c to 5g represent flavonoids. The absorption minima and maxima thus lead to separating them into two classes of compounds according to the data given by RIBEREAU-GAYON (1968) and MARBRY *et al.* (1970) (Table 3).

These are derivatives of phenolic acids (mainly hydroxycinnamic acids) and flavonoids, confirming the results of thin layer chromatography. Indeed, some of the compounds correspond to spots identified on the chromatoplates (Figure 3).

Other compounds (PC3 to PC6, F1, F2, F3, F4, F6, Q7, K3, K5) (Figure 3) were not characterized because of their very low concentrations. They are not detectable by HPLC.

The retention times of rutin and quercetin injected in the HPLC chromatograph corresponded to those of peaks 11 and 18 (Figure 4a). Consequently, the extracts probably contained these substances. The use of other control substances did not lead to the identification of other hydroxycinnamic derivatives.

HPLC with a diode array detector thus led to the characterization of 12 flavonoid derivatives and 7 derivatives of phenolic acids (Table 3).

HPLC determination of phenolic compounds

Figures 6 and 7 show the chromatograms recorded at 280 nm of purified extracts of phenolic compounds in glanded and glandless kernels. As mentioned above, the general appearance of the chromatograms is the same whatever the type of cotton plant considered. The only difference was in gossypol and related compounds (Figure 6) which are represented by the peaks beyond peak 19. There are at least 16 different peaks in this part of the chromatogram, preceding two major peaks which are probably two of the three gossypol tautomers.

Most of the phenolic acids - represented by about 10 peaks - have much shorter retention times than the flavonoids, which form much larger peaks. The peaks of less abundant compounds are recorded in comparison with the more selective diode array detection technique.

The phenolic compound contents of crushed kernels of glanded (Pavlikéni and Giza 75) and glandless (BC4 and F281) cottons and the contents and relative proportions of each family of phenolic compounds are shown in Table 4.

Conclusion

The phenolic substances in cotton seed kernels consist mainly of derivatives of phenolic acids: flavonoids and gossypol and related substances in glanded varieties. The phenolic acids are derivatives of cinnamic acids and are mainly p-coumaric and ferulic acids.

However, derivatives of caffeic acid were not observed (MAGA and LORENZ, 1974; DABROWSKI and SO-SULSKI, 1984) and neither were the derivatives of chlorogenic, sinapic, syringic, gentisic, vanillic, salicylic and protocatechic acids described by MAGA and LORENZ (1974) in glanded cotton seed kernels.

Flavonoids are represented by flavonols, consisting mainly of quercetin and kaempferol derivatives. 12 major flavonoids were characterized by HPLC; some of these are probably close to those identified in glandless cotton kernels by BLOUTIN *et al.* (1981), i.e.: isoquercitrin, rutin,

Glanded varieties display higher phenolics contents than glandless varieties due to the presence of free gossypol and practically identical flavonoid contents. The proportion of gossypol is high in comparison to the other phenolic compounds.

Flavonoids form the main fraction in glandless varieties, followed by phenolic acids. The relative proportions of flavonoids and phenolic acids are comparable whatever the variety.

robinoside 3-O quercetol, neohesperidoside 3-O quercetol, neohesperidoside 3-O kaempferol, glucoglucoside 3-O quercetol and glucoglucoside 3-O kaempferol.

PRATT and WENDER (1959, 1961) also reported the presence in cotton seed kernels of rutin, isoquercitrin, rhamnoglucoside 3-O kaempferol and glucoglucoside 3-O quercetol which belong to the groups of compounds characterized here.

Gossypol is only found in glanded cotton plants. Glanded seed kernels contain more phenolic compounds than glandless kernels due to the presence of gossypol.

The different families of soluble phenolic compounds are comparable in glanded and glandless cotton seed kernels except for the presence of gossypol and its derivatives which are characteristic in glanded varieties.

Análisis cromatográficos de los compuestos fenólicos de las almendras de las semillas del algodónero (*Gossypium hirsutum* y *G. barbadense* L.)

C. Tchiegang y J. Bourelly

Resumen

La cromatografía en capa delgada y la cromatografía en fase líquida de alta eficiencia asociadas con la espectrofotometría UV visible que utiliza un detector de barras de diodo han permitido mostrar que los compuestos fenólicos presentes en las almendras de las semillas del algodónero son los flavonoides (derivados del quercetol y del kaempferol), los ácidos fenólicos (derivados paracoumárico y ferulico), para las variedades «glandless» (sin glándula de gossipol) y, además, el gossipol para las almendras de los algodóneros de glándula.

En las almendras de las semillas de los algodóneros de glándula, el gossipol es el principal compuesto fenólico, seguido por los flavonoides y los ácidos fenólicos, mientras que en las almendras sin glándulas los flavonoides predominan respecto de los ácidos fenólicos. La concentración de compuestos fenólicos es inferior en las almendras de los algodóneros sin glándula.